BINDUNG VON PHARMAKA AN F-AKTIN

Arno Klein

...ss
...ünchen

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534927_0018

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Forth

BINDUNG VON PHARMAKA AN F-AKTIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Arno Klein

aus Karlsfeld

1982

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Kurz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Forth
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	13.03.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einführung	1
Methodik	3
Dialyse	4
Substanzen	6
Bestimmung der Dialysezeit	8
Elektrophoresen	9
Berechnung des gebundenen Anteils	10
Berechnung der Bindungskonstanten	11
Ergebnisse	13
Acetatelektrophorese	13
SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	14
Bindungsergebnisse	17
Kritik der Methoden und Ergebnisse	21
Diskussion	22
Zusammenfassung	26
Literaturverzeichnis	27

EINFÜHRUNG

Die Bindung von Pharmaka an Plasmaproteine ist bereits eingehend untersucht worden. Ergebnisse zur Bindung an Gewebe liegen dagegen erst in geringer Zahl vor. Für die Verteilung von Arzneimitteln im Organismus ist aber die Bindung an Gewebebestandteile von mindestens ebenso großer Bedeutung.

Bei der Skelettmuskulatur wurde die Bindung von Pharmaka vorzugsweise an intakte Muskeln oder Muskelhomogenat bestimmt. Die methodisch viel aufwendigere Untersuchung der Bindung von Pharmaka an isolierte Muskelproteine wurde bisher im wesentlichen für die Herzglykoside vorgenommen. Dabei stand weniger das Interesse für die „Proteinbindung" im Vordergrund. Vielmehr erhoffte man sich von der Untersuchung der Interaktion dieser Pharmaka mit den Muskelproteinen Aufschluß über den Mechanismus der pharmakologischen Wirkung. WASER berichtete 1962 über die Bindung von Herzglykosiden an Aktin, Myosin und Aktomyosin des Skelett- und Herzmuskels von Kaninchen und Kalb. 1969 verglichen GENAZZANI und SANTAMARIA die In-vitro-Interaktion verschiedener Herzglykoside mit Serumalbumin und Aktin, das aus Rinderherz- und -skelettmuskel isoliert wurde. Die Autoren fanden für das kontraktile Protein eine größere Bindungskapazität als für das Rinderserumalbumin. Keinen Unterschied konnten sie im Bindungsverhalten von Aktin aus Skelett- bzw. Herzmuskulatur feststellen.

Zur präparativen Darstellung des Aktins sind folgende Publikationen von Interesse: WASER sowie GENAZZANI und SANTAMARIA präparierten Aktin nach Methoden, wie sie nach MOMMAERTS (1951) oder TSAO und BAILEY (1953) angegeben wurden. ADELSTEIN et al. (1963) und KUEHL et al. (1975) isolierten Aktin nach STRAUB (1943), um die strukturelle Aminosäuresequenz von Aktin zu finden.

1971 zeigten WEIHING und KORN u.a. die identische elektrophoretische Reaktion von Aktin aus Acanthamoeba castellanii und Kaninchen-Skelettmuskel auf; sie kamen zu dem Schluß, daß aufgrund der gleichen Aminosäuresequenz bei Säugern, Vögeln, Reptilien, Amphibien, Fischen und Weichtieren mit dem Peptidnachweis die Einheitlichkeit des Aktins unabhängig von der Species erbracht ist.

CLARKE und SPUDLICH (1977) kommen durch eigene Untersuchungen und umfassende Auswertung der Literatur zu der Aussage, daß Aktin in nahezu allen Typen eukaryoter Zellen gefunden werden konnte.

Die Skelettmuskulatur, die etwa 40 % der Körpermasse ausmacht, besteht zu rund drei Viertel aus Wasser (BUDDECKE 1974). Abbildung 1 ist zu entnehmen, daß die festen Bestandteile des Muskels sich überwiegend aus Proteinen zusammensetzen;

von den löslichen Proteinen sind vor allem das Myoglobin und die Enzyme zu erwähnen, bei den Strukturproteinen im besonderen Aktin und Myosin. Aktin hat einen Anteil von ca. 20 % der gesamten Muskelproteine.

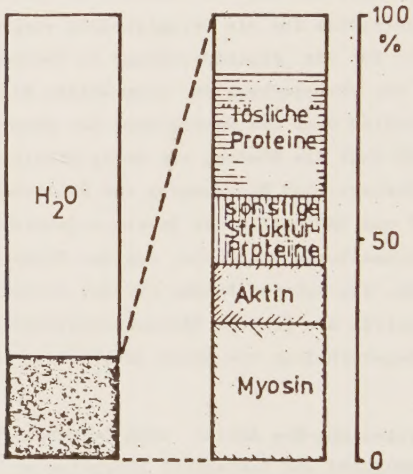


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der Skelettmuskulatur.

Aktin kommt im Muskel vor als ein in Filamenten angeordnetes Protein, daher F-Aktin genannt, im Gegensatz zur globulären Konformation, dem G-Aktin (STRYER 1975; GOODY u. MANNHERZ 1975); G-Aktin polymerisiert bei höheren Ionenstärken, besonders bei Anwesenheit von Magnesium-Ionen, und unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) zu F-Aktin.

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß Pharmaka an F-Aktin gebunden werden.

METHODIK

F-Aktin wurde in Anlehnung an die von ARNOLD und PETTE (1968) beschriebene Methode isoliert.

Dafür wurden ausgewachsene männliche und weibliche Kaninchen vom Typ Deutscher Widder getötet, ausgeblutet und die Viscera entfernt. Die Kadaver wurden für etwa drei Minuten in Eiswasser getaucht; bei Kühlraumtemperatur von 4° C wurden die Rückenmuskulatur und die weißen Muskeln (nach GANONG 1974; geringerer Myoglobin-Gehalt als die roten Muskeln) der Hinterläufe entfernt und auf Eis gelegt. Faszien, Sehnenansätze und Fett wurden soweit möglich wegpräpariert. Anschließend wurden die Muskeln durch einen Fleischwolf aus Kunststoff gedreht, bei dem die metallene Lochplatte und das Flügelmesser durch die entsprechenden Teile aus VA-40-Stahl ersetzt worden waren, damit der Kontakt des Muskels mit Schwermetall-Ionen möglichst gering gehalten werden konnte. Der Durchmesser der Löcher in der Platte betrug 2,5 mm. Der auf diese Weise aufbereitete Muskel wurde in gekühltem Phosphatpuffer (0.15 Mol / 1 K_2HPO_4/KH_2PO_4, 0.3 Mol / 1 KCl, pH 6.5) aufgeschwemmt, 15 Minuten gerührt und anschließend bei 2 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde im vierfachen Volumen 0.05 Mol / 1 $NaHCO_3$ suspendiert, 30 Minuten gerührt, zentrifugiert und im zehnfachen Volumen quarzdestillierten Wassers aufgeschwemmt. Nach dem Zentrifugieren wurde zum Sediment das vierfache Volumen gekühlten n-Butanols hinzugegeben und mit einem Homogenisator zweimal eine Minute lang suspendiert. Diese Suspension wurde wiederum gerührt und zentrifugiert. Das verbleibende Sediment wurde im vierfachen Volumen Aceton p.a. (18°C) mit dem Homogenisator resuspendiert, 15 Minuten gerührt und abzentrifugiert. Dieser Präparationsschritt wurde in gleicher Weise wiederholt. Anschließend wurde das Sediment zwischen Filterpapier ausgebreitet und im Luftstrom bei Zimmertemperatur getrocknet. In gekühlter niedermolarer ATP-Lösung (0.2 mMol / 1) wurde das Acetontrockenpulver (10 g / 300 ml) mit Hilfe des Homogenisators resuspendiert. Um die Suspension nicht zu erwärmen, geschah dies in kurzen Intervallen von ca. 15 Sekunden Dauer sechsmal. Während die Suspension eine Stunde lang gerührt wurde, konnte der pH-Wert auf 7.0 eingestellt werden. Dazu waren in der Regel zwischen 1,5 ml und 6 ml 0.2 N-HCl verwendet worden. Die Suspension wurde anschließend durch Gaze gefiltert, das Filtrat bei 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Polymerisation des Aktins mit 2.0 Mol / 1 KCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 50 mMol / 1 KCl eingestellt und für mehrere Stunden bei Zimmertemperatur asserviert.

Innerhalb von drei Stunden wurde das polymerisierte F-Aktin in der Ultrazentrifuge bei 105 000 g zum Niederschlag gebracht. Dem glasigen „Pellet" wurden 80 ml 0.2 mMol / 1 ATP-Lösung hinzugegeben und das Gemisch mehrere Stunden gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war. Bei 12 000 g wurde diese ATP-haltige Aktin-Lösung 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand wieder mit KCl auf eine Endkonzentration von 50 mMol / 1 eingestellt. Anschließend wurde der beschriebene Polymerisierungs-Depolymerisierungs-Schritt wiederholt. Die daraus resultierende klare G-Aktin-Lösung wurde auf 25 mMol / 1 KCl und 1 mMol / 1 $MgCl_2$ Endkonzentration mit 2 Mol / 1 KCl- und 0.1 Mol / 1 $MgCl_2$-Lösung, eingestellt. Nach dem sprunghaften Ansteigen der Viskosität durch Inkubation bei Raumtemperatur während einer Stunde wurde die Lösung bei 4°C aufbewahrt.

Ein abschließender Reinigungsschritt war die Zentrifugation bei 140 000 g für 90 Minuten. Mit dem Teflon-Glas-Potter wurde das transparente Pellet in einer Lösung aus 5 mMol / 1 KCl und 1 mMol / 1 $MgCl_2$ homogenisiert.

Der Proteingehalt wurde mit der Biuret-Methode bestimmt und die Konzentration des resuspendierten F-Aktins auf 5 mg / ml eingestellt. Für alle Lösungen wurde ausschließlich quarzdestilliertes Wasser verwandt, das ebenso wie alle benötigten Lösungsmittel (außer Aceton p.a.) auf 4°C herabgekühlt war. Bei dieser Temperatur wurden auch sämtliche Präparationen vorgenommen.

Dialyse

Die Bestimmung des gebundenen Anteils der untersuchten Pharmaka erfolgte mittels Gleichgewichtsdialyse (KURZ et al. 1977) bei pH 7.0 und 4°C. „Visking"-Dialyseschläuche wurden nach dreifachem Wässern, je 20 Minuten, zum Aufquellen gebracht und an einem Ende doppelt verknotet. Dann wurden sie durch Druckluft konstanten Zustroms entfaltet, aufgeblasen und nach einfachem Verknoten am anderen Ende in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Jeweils 3 ml einer F-Aktin-Lösung wurden in einen solchen Dialyseschlauch pipettiert, der dann mit einem zweiten Doppelknoten verschlossen und in ein Reagenzglas mit der entsprechenden Pharmaka- oder Pufferlösung (s. Tab. 2) gegeben wurde.

Die Gläser wurden luftdicht mit Parafilm, Aluminiumfolie und wiederum mit Parafilm verschlossen und so in die Dialysewippe (Abb. 3) gelegt, daß die Dialyseschläuche optimal von der Außenflüssigkeit umspült waren.

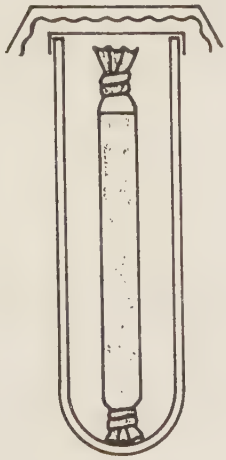


Abb. 2: Dialyseeinheit, bestehend aus gefülltem und verknotetem 'Visking'-Schlauch, umgeben von der Außenflüssigkeit im kleinlumigen (Innendurchmesser 12 mm), luftdicht verschlossenen Reagenzglas.

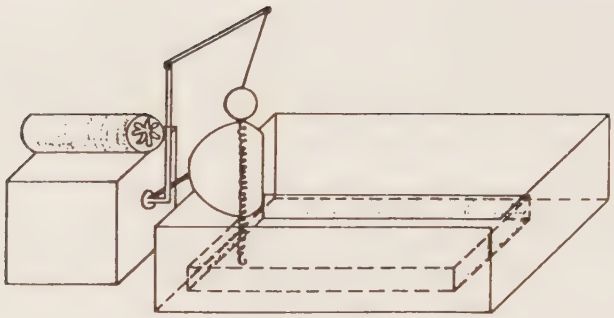


Abb. 3: Dialysewippe mit Antrieb.

Bis zur Einstellung des Gleichgewichts, d.h. bis die freie Konzentration des Pharmakons im System innen und außen gleich groß war, blieben die Reagenzgläser in der Dialysewippe.
Die Arzneimittel wurden in einem 0.05 Mol / l Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4) gelöst und von der jeweiligen Stammlösung die gewünschte Konzentration mit dem Puffer weiter verdünnt. Das pH des Puffers war 7.0, womit das physiologische pH der Muskulatur berücksichtigt und eine mögliche Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen mit anderen Untersuchungen, z.B. Muskelhomogenat oder am intakten Muskel, gewährleistet werden sollte.

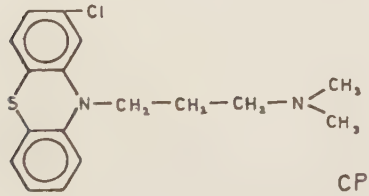
Substanzen und deren Nachweismethoden

Für die folgenden Substanzen wurde ihre Bindung an F-Aktin bestimmt:

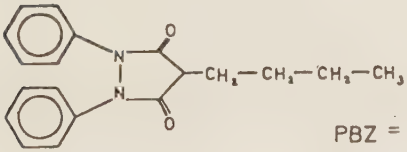
Tab. 1: Verwendete Substanzen.

Substanz		Molekulargewicht	Nachweismethode
Chlorpromazin-HCl	(CPZ)	355.50	(1)
Phenylbutazon-Na	(PBZ)	308.37	(2)
Propranolol-HCl	(PRO)	259.34	(3)
Thiopental-Na	(TPL)	264.33	(4)

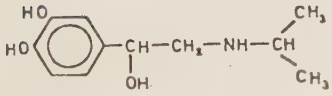
Lit.: (1): SALZMAN et al., 1956.
(2): BURNS et al., 1953.
(3): SHAND et al., 1969.
(4): BRODIE et al., 1950.



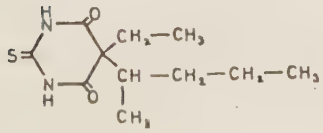
CPZ = CHLORPROMAZIN



PBZ = PHENYLBUTAZON



PRO = PROPRANOLOL



TPL = THIOPENTAL

Abb. 4: Strukturformeln und Abkürzungssymbole der verwendeten Substanzen.

Die Bindung von Chlorpromazin an F-Aktin wurde entsprechend der in Tab. 1 angegebenen Nachweismethode bestimmt; außerdem stand ein H^3-markiertes Präparat von New England Nuclear Corp. (Boston, MA) zur Verfügung, dessen spezifische Aktivität 26.5 Ci / mMol betrug. Die Reinheit des markierten Chlorpromazins wurde durch Dünnschichtchromatographie überprüft; sie war größer als 98%. Die Impulszahl der radioaktiv markierten Substanz wurde mittels eines Packard Szintillationszählers registriert.

Bei den anderen Arzneimitteln wurden nach dem Einstellen des Dialysegleichgewichts die Extinktionen in der Außenflüssigkeit spektralphotometrisch, bei Propranolol fluoreszenzphotometrisch zu bestimmt, um den proteingebundenen Anteil errechnen zu können (s. Tab. 1).

Bestimmung der Dialysezeit

Das Prinzip der Dialyse besteht darin, daß zwei Kompartimente mit Lösungen unterschiedlicher Ausgangskonzentration durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind. Diese Membran ist nur für das gelöste Pharmakon permeabel unter der Voraussetzung, daß die Teilchengröße kleiner ist als die Porengröße der Membran. Im Gleichgewicht muß die Konzentration des Pharmakons im proteinfreien Kompartiment der Konzentration des nicht gebundenen Anteils im proteinhaltigen Kompartiment entsprechen. Die für die Gleichgewichtseinstellung notwendige Zeit wurde in Vorversuchen ermittelt (siehe Abb. 5).

Wie aus Abb. 5 hervorgeht, ist nach einer Zeit von 5 - 6 Stunden sowohl für Thiopental wie auch für Chlorpromazin Gleichgewicht der Dialyse erreicht. Nachdem die Diffusionsgeschwindigkeit von der Teilchengröße bzw. der molekularen Masse (KURZ et al., 1977) abhängt, läßt sich ableiten, daß für Phenylbutazon und Propranolol ähnliche Zeiten gelten. Da die Dialysezeit in meinen Versuchen 35 - 40 Stunden betrug, kann für alle untersuchten Substanzen davon ausgegangen werden, daß nach dieser Zeit mit Sicherheit Gleichgewicht der Dialyse erreicht war.

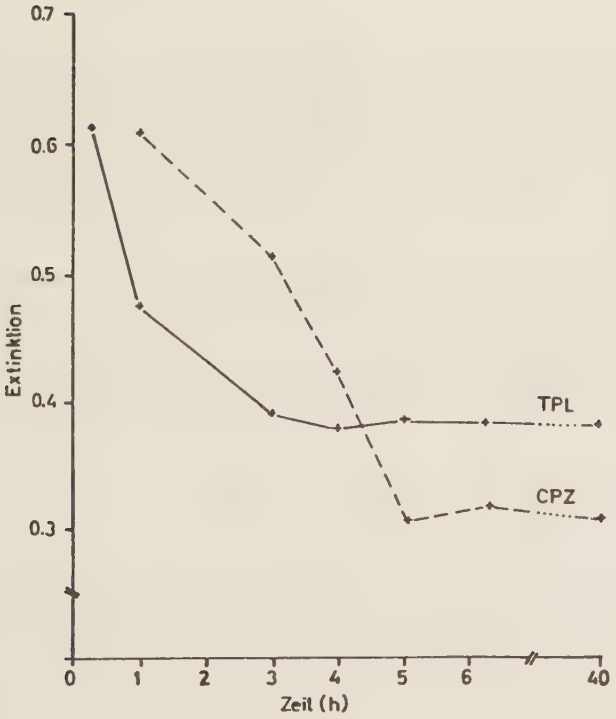


Abb. 5: Ermittlung der Zeit für die Gleichgewichtseinstellung. Konzentrationsänderungen (Extinktionen) von Chlorpromazin (CPZ ----) und Thiopental (TPL ——) in Abhängigkeit von der Zeit zur Bestimmung des Dialysegleichgewichts. Die eingetragenen Punkte sind Mittelwerte aus vier Versuchen.

Elektrophoresen

Die Reinheit der Präparationen von F-Aktin wurde mittels Acetatelektrophorese und der aufwendigeren SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese überprüft. Beide Verfahren zeigen bei unterschiedlicher Methodik die in Präparationen enthaltenen Verunreinigungen an.

Acetatelektrophorese

Sie trennt die Proteine nach ihrem Ladungsmuster auf. Nach SZENT-GYÖRGYI (1947) liegt der isoelektrische Punkt von F-Aktin bei pH 4.7. Den aggregierenden Effekt von Salzionen haben TSAO und BAILEY dadurch umgangen, daß sie das F-Aktin in sehr saurem oder sehr alkalischem Milieu elektrophoretisch untersuchten.

Dadurch konnte das F-Aktin nicht mehr aggregieren, und die Autoren kamen zu vergleichbaren Ergebnissen.

Die Elektrophoresebedingungen waren: 0.1 Mol / 1 H_3BO_3, 0.1 N NaOH, 0.1 Mol / 1 KCl; pH 10.0; 48 V; 14 mA; 8 Stunden, Färbung: Ponceau S; Multiphorese-Auswerter.

*SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Diese Elektrophorese trennt Proteine nach unterschiedlichem Molekulargewicht auf. Liegt ein Protein in Untereinheiten verschiedener Molekulargewichte vor (z.B. F-Aktin, Myosin), so werden auch diese aufgetrennt. Sie gestattet daher, das Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins zu bestimmen, wenn auf das Gel zusätzlich ein Proteingemisch mit bekannten Molekulargewichten aufgetragen wird (BOEHRINGER Mannheim, Combithek und Eichproteine der Fa. BIO RAD). Dies bedeutet, daß mit der SDS-Polyarylamidgel-Elektrophorese mehr an Information zu gewinnen ist als mit der Acetatelektrophorese. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode von LAEMMLI (1970) in der Modifikation von STUDIER (1973) verwendet. Die Konzentration des Gels betrug 10%.

Berechnung des gebundenen Anteils

Für die Dialyse wurden die Ansätze nach folgendem Schema je Pharmakon und Konzentration vorbereitet:

* SDS = Sodium dodecylsulfat

Tab. 2

Im Dialyseschlauch	Im Reagenzglas	Codierung
Puffer	Puffer	E'_o
F-Aktin plus Puffer	Puffer	E_o
F-Aktin plus Puffer	Pharmakon	E_1
Puffer	Pharmakon	E_2
3 ml		S
	3 ml	D
gebundener Anteil des Pharmakon in %		B

Der gebundene Anteil wird durch Einsetzen der gemessenen Extinktionswerte in folgende Formel berechnet:

$$B = 100\% - 100\% \cdot \frac{S\,(E_1 - E_o)}{(D + S)\,(E_2 - E'_o) - D\,(E_1 - E_o)}$$

Berechnung der Bindungskonstanten

Die Bindung der Pharmaka an Proteine kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$b = \frac{k \cdot n \cdot P}{1 + k \cdot f} \cdot f \qquad \text{(Gleichung 1)}$$

b: Konzentration der gebundenen Moleküle (Mol / l).
f: Konzentration der freien Moleküle (Mol / l).
P: Gesamte Proteinkonzentration (Mol / l).
n: Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekül.
k: Assoziationskonstante (l / Mol).

Hierbei sind k und n die Bindungskonstanten. Gleichung 1 kann so umgeformt werden, daß sich die Konstanten wie folgt ergeben:

(Gleichung 1) · (1 + k · f)

b · (1 + k · f) = k · n · P · f

b + b · k · f = k · n · P · f

b = k · n · P · f - b · k · f | : f

b : f = k · n · P - b · k (Gleichung 2)

Der Form nach entspricht die Gleichung 2 einer Geradengleichung:

Y = a - b · x

Diese mathematische Ableitung erlaubt, wie später abgebildet, die graphische Darstellung der Bindungsergebnisse im Koordinatensystem als Gerade, ohne die Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekul vorauszusetzen. So kann b/f gegen b graphisch aufgetragen werden, nachdem verschiedene Konzentrationen je Pharmakon gemessen worden sind; dabei entspricht k der Steigung der Geraden, also tg α, das Produkt aus k, n und P dem Abschnitt auf der Ordinate.

ERGEBNISSE

Acetatelektrophorese

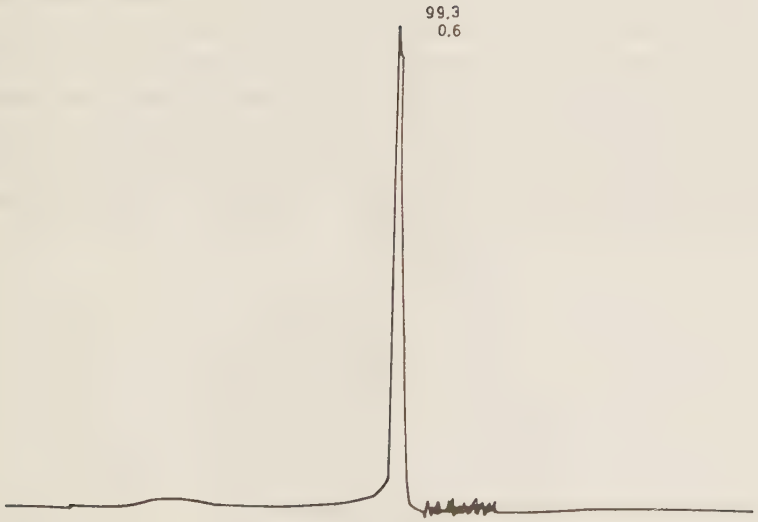


Abb. 6: Beispiel einer acetatelektrophoretischen Auswertung einer F-Aktin-Präparation

Der Reinheitsgrad wurde durch einen Schreiber mit eingebautem Integrator ermittelt. Es zeigte sich, daß das Kurvenbild des graphischen Ausdruckes bei den verschiedenen Präparationen gleich bleibt. Wie in Abbildung 6 dargestellt, ergab sich jeweils nur ein Maximum. Mögliche Verunreinigungen waren lediglich den numerischen Ausdrucken zu entnehmen. Dabei schwankten die Zahlenangaben in einer Größenordnung von 0.6 % bis 2.6 %.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Identität (Bestimmung des Molekulargewichts) und Reinheit (nur eine Aktin-Bande) wurde durch SDS-Polyarylamidgel-Elektrophorese nachgewiesen. Entsprechend dem Verfahren von LAEMMLI (1970) wurde das F-Aktin ebenso wie die Eichproteine auf ein Gel aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese geschah die Bestimmung des Molekulargewichts von Aktin durch die graphische Aufzeichnung der Logarithmen der bekannten Molekulargewichte der Eichproteine gegen die Wanderungsstrecke in Zentimeter (s. Abb.8). Daraus konnte auf ein Molekulargewicht für G-Aktin mit 43 000 ± 700 geschlossen werden. Da F-Aktin ein zu Filamenten angeordnetes G-Aktin ist - die SDS-Elektrophorese jedoch das F-Aktin in Untereinheiten aufspaltet -, erhält man das Molekulargewicht der monomeren Form des Aktins, also des G-Aktins (PRESTON und GRAHAM 1972). Es wird durch eine Bande auf dem Gel repräsentiert (s. Abb.7), womit gleichzeitig die Homogenität der Präparation nachgewiesen wird. Die Bestimmung des Molekulargewichts ist der Abbildung 8 zu entnehmen.

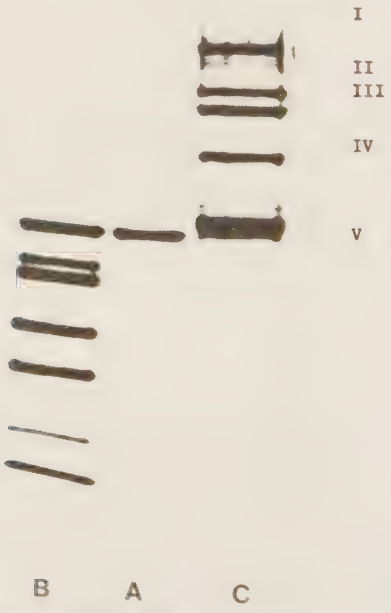


Abb. 7: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. (A) Gereinigte Aktinpräparation. (B) Zwischenstufe einer noch unreinen Aktinpräparation. (C) Eichproteine (BioRad): I = Myosin (MG 200 000), II = β-Galaktosidase (MG 116 250), III = Phosphorylase B (MG 92 500), IV = Albumin (MG 66 200), V = Ovalbumin (MG 45 000).

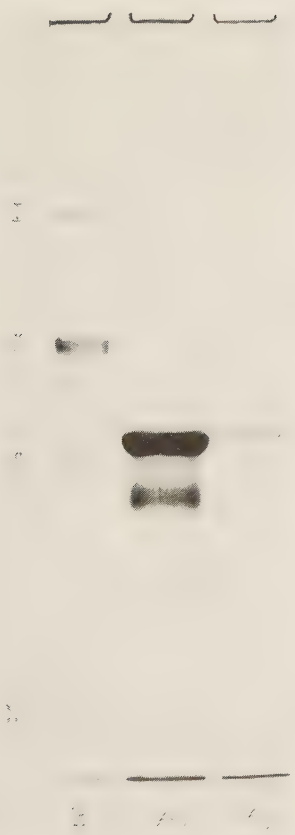


Abb. 8 a: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (10%iges Acrylamid)

A_{1-2}: Aktinpräparationen

B : Eichproteine:
- I = β'-Untereinheit (MG 165 000) und β -Untereinheit (MG 155 000) von RNA-Polymerase aus E.coli
- II = Rinderserumalbumin (MG 68 000)
- III = α-Untereinheit (MG 39 000) von RNA-Polymerase aus E.coli
- IV = Trypsin-Inhibitor (MG 21 500)

Die bei B zwischen II und III sichtbare Bande stammt von Aktinspuren, die beim Auftragen übergelaufen waren. Bei den anderen Elektrophoresen trat diese Bande nicht auf.

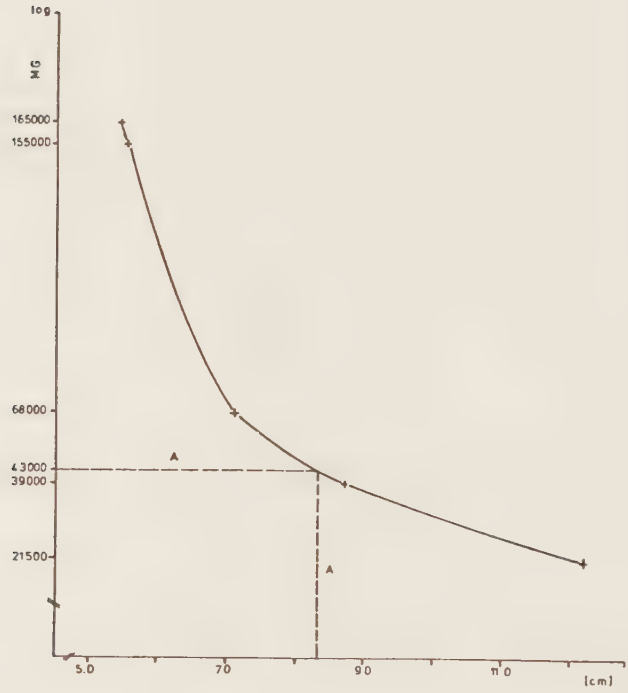


Abb. 8 b: Elektropherogramm mit Eichproteinen (Boehringer) zur Bestimmung des Molekulargewichts von Aktin (A). Gleiche Eichproteine wie in Abb. 8 a.

Bindungsergebnisse

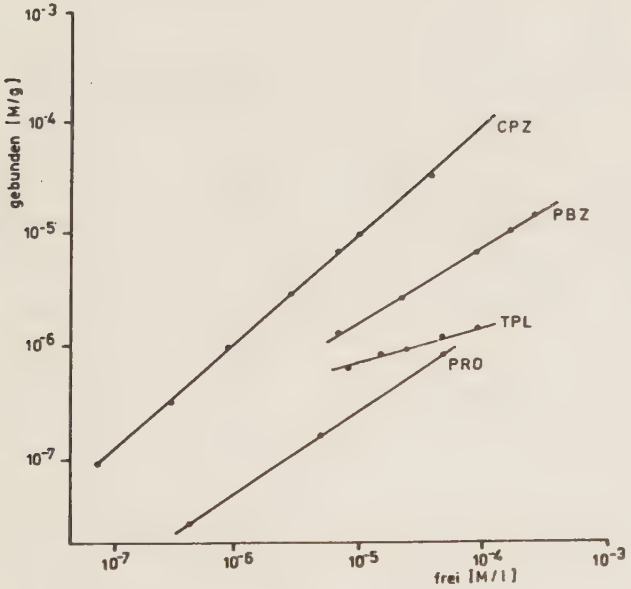


Abb. 9 : Bindung der Pharmaka an F-Aktin

Chlorpromazin (CPZ), Phenylbutazon (PBZ), Thiopental (TPL), Propranolol (PRO). Die Punkte stellen Mittelwerte aus vier bis sechs Versuchen dar. Variationskoeffizienten < 5 %.

Da logarithmische Auftragung die Kennzeichnung von Streuungen nicht sinnvoll wiedergibt, sind diese in Taelle 3 numerisch zusammengestellt.

Der Darstellung ist zu entnehmen, daß über einen weiten Konzentrationsbereich hinweg eine lineare Beziehung zwischen den Logarithmen der gebundenen Menge der Pharmaka pro Gramm Eiweiß und der freien Konzentration besteht. Interessant ist, daß im untersuchten Konzentrationsbereich keine Anzeichen für eine Sättigung zu erkennen sind. Weiter geht aus der Abbildung hervor, daß Chlorpromazin von F-Aktin am stärksen gebunden wird, gefolgt von Phenylbutazon, Thiopental und Propranolol.

Tab. 3 : Mittelwerte und Streuungen der Bindung an F-Aktin

c = Konzentration der Pharmaka in g/l zu Beginn der Dialyse. Proteinkonzentration 5 mg / ml.
$\bar{x}$ = Mittelwerte des an Aktin gebundenen Pharmakons in Prozent.
s = Standardabweichung.

CPZ

c	$\bar{x} \pm s$
6.10^{-4}	72.0 ± 1.12
4.10^{-4}	77.5 ± 1.22
2.10^{-4}	78.6 ± 1.42
6.10^{-5}	81.8 ± 1.15
4.10^{-5}	82.5 ± 0.70
2.10^{-5}	83.9 ± 0.84

H^3-CPZ

c	$\bar{x} \pm s$
6.10^{-5}	81.7 ± 0.25
2.10^{-5}	82.3 ± 0.13
6.10^{-6}	84.1 ± 0.21
2.10^{-6}	79.4 ± 2.74
6.10^{-7}	85.5 ± 0.57

PBZ

c	$\bar{x} \pm s$
6.10^{-4}	21.7 ± 1.05
2.10^{-4}	25.7 ± 0.80
6.10^{-5}	36.4 ± 1.22
2.10^{-5}	50.7 ± 1.05

TPL

c	$\bar{x} \pm s$
2.10^{-4}	7.5 ± 0.69
6.10^{-5}	14.8 ± 1.35
4.10^{-5}	19.8 ± 1.15
2.10^{-5}	26.7 ± 1.35

PRO

c	$\bar{x} \pm s$
10^{-4}	10.6 ± 1.50
10^{-5}	14.2 ± 1.80
10^{-6}	25.0 ± 1.90

Der zu untersuchende Konzentrationsbereich war nach oben durch die maximale Löslichkeit der Pharmaka im Puffer, nach unten durch die Nachweisbarkeitsgenauigkeit der zur Verfügung stehenden optischen Meßmethoden begrenzt. Das Tritium-markierte Chlorpromazin nimmt gegenüber den anderen Pharmaka eine Sonderstellung ein; mit ihm konnte bei niedrigeren Konzentrationen gemessen werden. Die Werte für Chlorpromazinbindung im mittleren Drittel der Kurve in Abbildung 9 wurden sowohl mit der markierten als auch mit der nicht markierten Substanz bestimmt; die ermittelten Werte waren mit beiden Methoden gleich groß.

Werden die Ergebnisse nach Art eines SCATCHARD Plot's aufgetragen, so ergeben sich hyperbelartige Kurven. Abbildung 10 zeigt eine solche Auftragung am Beispiel des Chlorpromazins. Dabei wurde der Quotient aus gebundener Menge Pharmakon (c_b) und Gesamtmenge Eiweiß (F) durch die freie Konzentration des Pharmakons (c_f) dividiert und gegen ebenjenen Quotienten aufgetragen (STANISLAUS 1976).

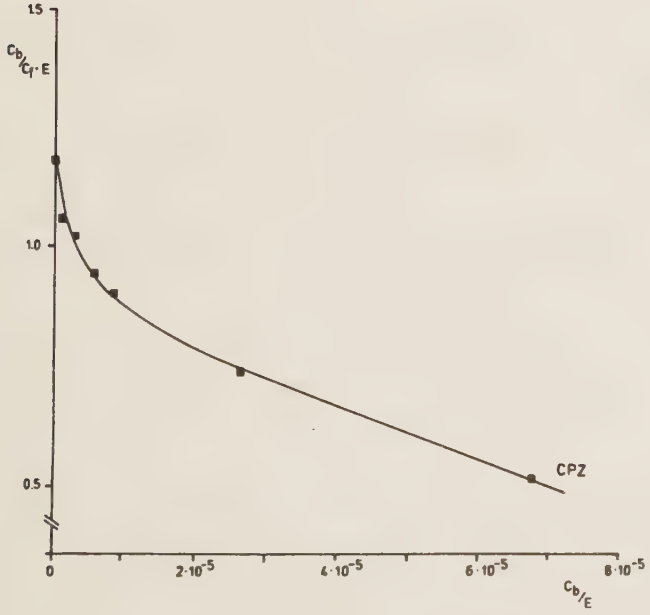


Abb. 10 : Bindung von Chlorpromazin an Aktin als SCATCHARD Plot aufgetragen.

Für das nicht markierte Chlorpromazin wurde zusätzlich untersucht, ob unter den nämlichen Bedingungen, wie zu den Bindungsversuchen angegeben (gleiches Präparationsverfahren, gleicher Proteingehalt, gleiche Dialyse und Nachweismethode), eine Temperaturabhängigkeit der Bindung an F-Aktin besteht. Dazu wurde die Dialyse zum einen wie üblich bei Kühlraumtemperatur durchgeführt, zum anderen in einem Wasserbad bei 37° C. Es zeigte sich, daß im untersuchten Konzentrationsbereich die Bindung von Chlorpromazin an F-Aktin bei 4°C und 37°C gleich groß ist.

Kritik der Methoden und Ergebnisse

Die Bestimmung des gebundenen Anteils der untersuchten Pharmaka erfolgte mit der Gleichgewichtsdialyse. KURZ et al. (1977) stellten dem Dialyseverfahren die Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Gelfiltration gegenüber. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß unter Einhaltung bestimmter Bedingungen die Gleichgewichtsdialyse das Mittel der Wahl sei. Solche Bedingungen sind z.B.: einheitliche Porengröße des Dialyseschlauches, Molekulargewichts des Pharmakons unter 600, niedrige Proteinkonzentration usw. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Bedingungen berücksichtigt.

Die Temperatur für die Dialyse betrug 4° C. Folgende Gründe waren für diese unphysiologische Temperatur ausschlaggebend: 1) einer möglichen Proteindenaturierung während der Dialysezeit vorzubeugen; 2) eine mögliche Zersetzung der Pharmaka zu vermeiden; 3) eine vergleichbare Bedingung zu Untersuchungen am Muskelhomogenat und intakten Muskel (s. Tab. 4) zu schaffen.

Für Chlorpromazin konnte gezeigt werden, daß die Messung der Bindung bei 4° C auch für die Bindung bei 37° C relevant war.

Bei den optischen Bestimmungen der Konzentration der Pharmaka lagen die Ergebnisse im Bereich der methodischen Meßgenauigkeit. Dies ist den Streuungen zu entnehmen (Streuungen in Tab. 3). Die Genauigkeit der Biuretbestimmungen wurde mit gefriergetrocknetem Rinderserumalbumin als Standard bzw. durch die aufwendigere Methode zur Eiweißbestimmung nach LOWRY geprüft.

Nach der Bestimmung des Aktingehalts jeder Präparation wurden sofort die Dialyseansätze vorbereitet, damit eine mögliche bakterielle Kontamination verhindert wurde. Die für die Elektrophorese zurückbehaltenen Proben mußten zunächst eingefroren werden. Es ist möglich, daß die bei der Elektrophorese neben dem Aktin in geringer Menge gefundenen anderen Proteine durch Veränderung des Aktins beim Wiederauftauen der Proben entstanden sind. In diesem Fall wäre die Reinheit des Aktins im Dialyseansatz sogar höher, als dies im Elektropherogramm zum Ausdruck kommt.

Durch Anwendung der beschriebenen Präparationsmethode gelang es, das Aktin aus dem Kaninchenmuskel in wesentlich höherer Reinheit zu erhalten als mit den zunächst benutzten Fällungsmethoden. Die höhere Reinheit ging jedoch zu Lasten der Ausbeute, und diese war mit 250 - 300 mg F-Aktin pro Kaninchen sehr gering. Der große Aufwand für die Gewinnung des reinen Aktins zwang dazu, die Anzahl der untersuchten Substanzen zu beschränken. Aus dem gleichen Grund mußte darauf verzichtet werden, den Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration auf die Bindung der Pharmaka an Aktin zu untersuchen.

DISKUSSION

Das von SZENT-GYÖRGYI (1947) entdeckte Aktin sollte in möglichst reiner Form präpariert und die Bindung von Pharmaka untersucht werden.

Die in der Literatur angegebenen Verfahren zur Isolierung sind sicherlich seither verbessert worden; die Beschreibung der methodischen Angaben für die Präparation sind jedoch im Vergleich zur Ausführlichkeit der Interpretation der Ergebnisse bescheiden. Wir haben versucht, auf der Basis der von ARNOLD und PETTE (1968) beschriebenen Präparation ein möglichst reines F-Aktin zu isolieren. Dies konnte mit Hilfe von Elektrophoresen nachgewiesen werden. Mittels der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese konnte zusätzlich das Molekulargewicht für die monomere Form des F-Aktins bestimmt werden, der gefundene Wert von 43 000 $\pm$ 700 liegt in der Größenordnung, die in der neueren Literatur (ELZINGA et al. 1973, 42 000; GILLIBRAND 1972, 47 000 $\pm$ 900; CLARKE et al. 1977, 42 000) zu finden ist, im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (TSAO 1953, 74 000). Der Bereich, in dem sich die Angaben zum Molekulargewicht heute bewegen, hängt sicherlich nicht nur vom Präparationsverfahren ab, sondern auch von der Methode der Bestimmung des Molekulargewichts.

Die Bindung eines Pharmakons ist abhängig von seinem chemischen Charakter, seiner Struktur, dem pK-Wert der Substanz und der Wasserstoff-Ionen-Konzentration. Pharmakodynamisch wirksam ist jeweils nur der freie Anteil der Substanz. Wird von einem Gewebe ein Pharmakon gebunden, so ist die Wirkung der Substanz um das Ausmaß der Bindung reduziert. In welch unterschiedlicher Größenordnung die untersuchten Substanzen von F-Aktin gebunden wurden, gibt Tabelle 3 wieder. Es ist bemerkenswert, daß alle vier untersuchten Pharmaka gebunden wurden.

Die folgende Tabelle soll einen qualitativen Überblick über die Reihenfolge von den an F-Aktin gebundenen Substanzen im Vergleich der Bindung dieser Substanzen an andere Strukturen bzw. Systeme geben.

Tab. 4: Rangfolge der abnehmenden Bindungen von Chlorpromazin, Phenylbutazon, Thiopental, Propranolol an Muskel und Muskelbestandteile.

F-Aktin (1)	CPZ	>	PBZ	>	TPL	> PRO
Myosin (1)	CPZ	>	PBZ	>	TPL	> (PRO)
Homogenisierter Muskel (2)	CPZ	>	PRO	>	TPL	> PBZ
Intakter Muskel (3) (Inkubiertes Zwerchfell)	CPZ	>	PRO	>	TPL	> PBZ

Lit.: (1) KLEIN et al., 1979
(2) FICHTL et al., 1980
(3) FICHTL und KURZ (noch nicht veröffentlicht).

Aus der Tabelle geht hervor, daß jeweils Chlorpromazin am stärksten gebunden wird. Bei den kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin ist die Reihenfolge der Substanzen gleich, nämlich CPZ > PBZ > TPL > PRO. Eine Ausnahme bildet das Propranolol, für das beim Myosin keine Bindung festgestellt werden konnte. Für homogenisierten und intakten Muskel ist die Reihenfolge der Pharmaka untereinander ebenfalls gleich; Chlorpromazin wird auch von diesen beiden am stärksten gebunden, aber die Reihenfolge der anderen Substanzen ist gerade umgekehrt gegenüber der bei den kontraktilen Proteinen.

Es konnte gezeigt werden, daß das gereinigte F-Aktin Arzneimittel bindet. Diese werden in unterschiedlichem Ausmaß gebunden, wobei offensichtlich der hydrophobe Charakter (Angaben gemäß Literatur zu Tab. 1) eine entscheidende Rolle spielt.

Am Beispiel des Chlorpromazins ist außerdem ein zahlenmäßiger Vergleich der Bindung an Aktin mit der Bindung an Plasma, Myosin und Mikrosomen möglich (Tab. 5).

Tab. 5: Bindung von Chlorpromazin.

		$K_1 \cdot 10^{-4}$	C_1	$K_2 \cdot 10^{2}$	C_2
F-Aktin	(1)	15 - 31	4.9 - 10.2	12 - 53	800 - 1200
Myosin	(1)	5.0 - 8.6	3.7 - 5.6	1.3 - 3.1	390 - 780
Mikrosomen (Skelettmuskel)	(2)	1.7	260	18	690
Mikrosomen (Leber)	(3)	14	161	39	554
Plasma	(4)	1.5	15	14	52

K = Assoziationskonstanten (in M^{-1}); C = Bindungskapazitäten (in µM / g Protein).

Lit.: (1): KLEIN et al., 1979
(2), (3): BICKEL und STEELE, 1974
(4): BICKEL, 1975

Besonders bemerkenswert ist, daß bei den kontraktilen Proteinen die Bindungskapazität pro Gramm Eiweiß der Bindungsstellen mit hoher Affinität sehr viel geringer ist als bei den Mikrosomen. Berücksichtigt man die große Gesamtmenge der kontraktilen Proteine, so ergibt sich insgesamt dennoch eine erhebliche Bindungskapazität auch für Aktin und Myosin.

Die Bindungsdaten für Chlorpromazin wurden in Abbildung 10 nach Art eines SCATCHARD Plot's dargestellt. Die hyperbelartige Form einer Kurve für Bindungsdaten kann durch zwei Klassen von Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität erklärbar sein oder damit, daß durch eine stattfindende Bindung des Pharmakons an einem Rezeptor eine Konformationsänderung des Proteins eintritt, so daß die vorhandenen Bindungsstellen sich gegenseitig beeinflussen.

Unter der Annahme, daß hyperbelartige Kurven durch zwei Klassen von Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität bedingt werden, konnten die entsprechenden Parameter mittels nicht linearer Regression ermittelt werden (Tab. 5).

Die beschriebenen Versuche waren In-vitro-Untersuchungen. Eine Übertragung der Ergebnisse auf In-vivo-Verhältnisse kann nicht abgeleitet werden. Die Reihenfolge der Bindung von Pharmaka mag dort anders aussehen. Es dürfte jedoch technisch kaum möglich sein, die Bindung an isolierte Proteine unter In-vivo-Verhältnissen zu bestimmen. Für den Unterschied in der Reihenfolge der gebundenen Substanzen zwischen F-Aktin und dem homogenisierten und intakten Muskel dürfte als Erklärung anzuführen sein, daß im Muskelgewebe außer F-Aktin noch andere Proteine sowie Lipide enthalten sind, an welche die Pharmaka ebenfalls gebunden werden können (FICHTL et al. 1980).

ZUSAMMENFASSUNG

In Anlehnung an die von ARNOLD und PETTE (1968) beschriebene Methode wurde F-Aktin aus Kaninchen-Skelettmuskulatur isoliert.

Das Molekulargewicht für G-Aktin, der monomeren Form des F-Aktin wurde mit 43 500 ± 700 bestimmt; die Prüfung des Reinheitsgrades der Präparationen geschah mit der Acetatelektrophorese und der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Der Proteingehalt wurde mit der Biuretmethode bestimmt.

Der gebundene Anteil der untersuchten Pharmaka wurde durch Gleichgewichtsdialyse bei pH 7.0 und 4°C ermittelt. Dabei konnte festgestellt werden, daß Propranolol (PRO), Thiopental (TPL), Phenylbutazon (PBZ) und Chlorpromazin (CPZ) in der angegebenen Reihenfolge in steigendem Ausmaß an das isolierte F-Aktin (5 mg/ml) gebunden werden. Untersuchungen mit Tritium-markiertem CPZ bestätigen die ermittelten Bindungsergebnisse für dieses Pharmakon. Bei einer Konzentration von 10^{-6} Mol/l freiem CPZ und einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml wird CPZ an F-Aktin zu rund 84% gebunden.

Unter Berücksichtigung physiologischer Mengenverhältnisse der kontraktilen Proteine Aktin und Myosin besitzt Myosin die höhere Bindungskapazität für CPZ, PBZ und PRO; für TPL ist sie etwa gleich.

Die unterschiedliche Reihenfolge der gebundenen Substanzen bei homogenisiertem und intaktem Muskel (PBZ, TPL, PRO, CPZ) im Gegensatz zu der bei F-Aktin läßt den Schluß zu, daß auch anderen im Muskel vorkommenden Proteinen und Lipiden für die Bindung dieser Pharmaka eine Bedeutung zukommt.

Literaturverzeichnis

ADELSTEIN, R.S., GODFREY, J.E., KIELLEY, W.W.
G-Actin: Preparation by Gel Filtration and Evidence for a Double Stranged Structure
Biochem. Biophys. Res. Commun. 12 (1) (1963) 34-38.

ARNOLD, H., PETTE, D.
Binding of Glycolytic Enzymes to Structure Proteins of the Muscle
Europ. J. Biochem. 6 (1968) 163-171.

BICKEL, M.H., STEELE, J.W.
Binding of basic and acidic drugs to rat tissue subcellular fractions
Chem. Biol. Interact. 8 (1974) 151-162.

BICKEL, M.H.
Binding of chlorpromazine and imipramine to red cells, albumin, lipoproteins and other blood components
J. Pharm. Pharmac. 27 (1975) 733-738.

BOEHRINGER Mannheim GmbH
Combithek. Eichproteine für SDS-Elektrophorese
Biochemica.

BRODIE, B.B., MARK, L.C., PAPPER, E.M., LIEF, P.A., BERNSTEIN, E., ROVENSTINE, E.A.
The fate of thiopental in man and a method for its estimation in biological material.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 98 (1950) 85-96.

BUDDECKE, E,
Grundriß der Biochemie
4. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1974, 455.

BURNS, J.J., ROSE, R.K., CHENKIN, T., GOLDMAN, A., SCHULERT, A., BRODIE, B.B.
The physiological disposition of phenylbutazone (Butazolidin) in man and a method for its estimation in biological material
J. Pharmacol. Exp. Ther. 109 (1953) 346-357.

CLARKE, M., SPUDICH, J.A.
Nonmuscular Contractile Proteins: The Role of Actin and Myosin in Cell Motility and Shape Determination
Ann. Rev. Biochem. 46 (1977) 797-822.

ELZINGA, M., COLLINS, J.H.
The Primary Structure of Actin from Rabbit Skeletal Muscle
J. Biol. Chem. 250 (1971) 5897-5904, 5906-5911, 5915-5920.

ELZINGA, M., COLLINS, J.H., KUEHL, W.M., ADELSTEIN, R.S.
Complete Amino-Acid Sequence of Actin of Rabbit Skeletal Muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70 (1973) 2687-2691.

FICHTL, B., BONDY, B., KURZ, H.
Binding of Drugs to Muscle Tissue: Dependence on Drug Concentration and Lipid Content of Tissue.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1 (215) (1980) 248-253.

GANONG, W.F.
Physiologie
3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974, 51.

GENAZZANI, E., SANTAMARIA, R.
Interaction of Cardiac Glycosides with Serum Albumin and Contractile Proteins
Pharmacol. Res. Commun. Vol. 1 No. 3, 1969.

GILLETTE, J.R.
Other Aspects of Pharmacokinetics
in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Berlin, Heidelberg, New York, 28 (1971) 35-85.

GILLIBRAND, I.M.
A Study of Aggregation Phenomena Occuring in Actin Solutions during Depolymerisation
Biochem. J. 127 (1972) 737-739.

GOODY, R.S., MANNHERZ, H.G.
The Interaction of Adenosine Triphosphate and its Analogs with Myosin and the Modification by Actin
in: SUND, H., BLAUER, G.
Protein - Ligand Interactions
Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1975, 109-127.

KLEIN, A., ZRENNER, J., FICHTL, B., KURZ, H.
Binding of drugs to tissue proteins: Actin and Myosin
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307: suppl. R 5 1979.

KURZ, H., TRUNK, H., Weitz, B.
Evaluation of Methods to Determine Protein-Binding of Drugs
Arzneimittel-Forschung (Drug Res.) 27 (1977) 1373-1380.

KUEHL, W.M., CONTI, M.A., ADELSTEIN, R.S.
Structural Studies on Rabbit Skeletal Muscle Actin
J. Biol. Chem. 250 (1975) 5890-5896.

LAEMMLI, U.K.
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T 4.
Nature 227 (1970) 680-685

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent
J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275.

MOMMAERTS, W.F.H.M.
Reversible Polymerisation and Ultracentrifugal Purification of Actin
J. Biol. Chem. 188 (1951) 545.

PRESTON, F.B., GRAHAM, G.N.
Determination of the Molecular Weights of Actins from different Species by Gel Chromatography
Biochem. J. 127 (3) (1972) 75-76P

SALZMAN, N.P., BRODIE, B.B.
Physiological disposition and fate of chlorpromazine and a method for its estimation in biological material
J. Pharmacol. Exp. Ther. 118 (1956) 46.

SHAND, D.G., NUCKOLLS, E.M., DATES, J.A.
Plasma propranolol levels in adults
Clin. Pharmacol. Ther. 11 (1969) 112-115

STANISLAUS, F.
Studie zur Bestimmung und Auswertung der Eiweißbindung
1976.

STRAUB, F.B.
Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged 3 (1943) 23.

STRYER, L.
Biochemistry
W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1975, 832.

STUDIER, F.W.
Analysis of Bacteriophag T 7 Early RNAs and Proteins on Slab Gels
J. Mol. Biol. 79 (1973) 237-248.

SZENT-GYÖRGYI, A.
Chemistry of Muscular Contraction
Academic Press., New York, 1947, 148-151.

TSAO, T.-C.
The Molecular Dimension of the Monomer-Dimer Transformation of Actin
Biochim. Biophys. Acta 11 (1953) 227-235.

TSAO, T.-C.
The Interaction of Actin, Myosin and Adenosine Triphosphate
Biochim. Biophys. Acta 11 (1953) 236-243.

TSAO, T.-C., BAILEY, K.
The Extraction, Purification and some Chemical Properties of Actin
Biochim. Biophys. Acta 11 (1953) 102-113.

WASER, P.
Proc. Intern. Pharmacol. Meeting, Stockholm, 1961, 3, 173
1962 in Chemical Abstracts 7545 h, 1964.

WEIHING, R.R. , KORN, E.D.
Acanthamoeba Actin. Isolation and Properties
Biochemistry, 10 (1971) 590-600

Lebenslauf

Am 23. Januar 1949 wurde ich als einziges Kind von H. und E. Klein in Emtmannsberg, Landkreis Bayreuth, geboren.
In Selb besuchte ich die Volksschule bis 1959, trat dann in die Oberrealschule Selb ein, später Dachau und München, wo ich 1970 das Abitur ablegte. In diesem Jahr immatrikulierte ich mich an der LMU München für das Fach Psychologie. 1974 erfolgte die Immatrikulation für Humanmedizin, ebenfalls an der LMU München. 1975 schloß ich mein Studium als Diplom-Psychologe ab. Anschließend absolvierte ich gemäß der neuen Approbationsordnung das Medizinstudium in München.